

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02112338.1

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 19/00

C12N 15/11 C12N 15/63

C12N 15/64 A61K 39/395

A61P 29/00 A61P 19/02

A61P 37/02

[43] 公开日 2004 年 1 月 7 日

[11] 公开号 CN1465597A

[22] 申请日 2002.7.1 [21] 申请号 02112338.1

[71] 申请人 上海兰生上科创业投资有限公司

地址 200120 上海市浦东南路 528 号上海证  
券大厦北塔 2303 室

[72] 发明人 马 菁

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 余 颖

权利要求书 1 页 说明书 26 页 附图 2 页

[54] 发明名称 含可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra 的融合蛋白, 其制备方法, 及其药物组合物

[57] 摘要

本发明涉及含可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体 p75 和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra 的融合蛋白, 编码所述融合蛋白的核酸分子, 制备本发明融合蛋白的方法以及含有本发明融合蛋白的药物组合物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

1. 一种融合蛋白，包含人可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体，人免疫球蛋白 Fc 片段和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra，其氨基酸序列包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。
2. 一种融合蛋白，包含人可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体，连接序列和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra，其氨基酸序列包含 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4。
3. 一种核酸分子，编码权利要求 1 所述的融合蛋白，包含 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:6 所示的序列。
4. 一种核酸分子，编码权利要求 2 所述的融合蛋白，包含 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:8 所示的序列。
5. 一种表达载体，包含任选自 SEQ ID NO:5 至 SEQ ID NO:8，和与之操作性连接的表达调控序列。
6. 一种宿主细胞，含有权利要求 5 所述的表达载体。
7. 根据权利要求 6 所述的宿主细胞，它是 CHO。
8. 权利要求 1 或 2 所述融合蛋白的制备方法，其步骤包括：
- 1) 提供编码融合蛋白的核酸序列，所述序列选自 SEQ ID NO:5 至 SEQ ID NO:8；
- 2) 构建合适的表达载体；
- 3) 将该表达载体导入合适的宿主细胞；
- 4) 在适合表达的条件下培养转化宿主细胞；
- 5) 收集上清液，并纯化融合蛋白产物。
9. 一种用于治疗类风湿性关节炎的药物组合物，其中包含权利要求 1 或 2 所述融合蛋白和药学上认可的载体。

含可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra 的  
融合蛋白，其制备方法，及其药物组合物

### 技术领域

5 本发明涉及含可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra 的  
融合蛋白，其制备方法，及其药物组合物。

### 背景技术

类风湿性关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种世界范围内的常见疾病，体  
现为四肢关节红、肿、疼痛，严重影响患者的生活质量，如不治疗，一般 2 年内  
10 就可以造成关节强直畸形等永久性后遗症。在美国该病的发病率为将近 1%[1]。  
国内尚无可靠的发病率统计数字，估计与美国接近，是严重影响健康的疾病，对  
社会造成的损失是难以估计的。

目前临床治疗 RA 的方案很多，首选用大剂量非甾体抗炎药可控制症状，如  
无效，则临床首选氨甲蝶呤等免疫抑制药治疗。约四分之一的患者首次发病后经  
15 及时治疗可终生不再复发，约二分之一的患者经治疗后症状暂时得以缓解，但仍  
会反复发作，部分最终发展为关节功能障碍；约四分之一的患者对目前所有的常  
规治疗均无效。

与 RA 炎症相关的细胞因子有白细胞介素-1(IL-1)，肿瘤坏死因子(TNF)，白  
细胞介素 6(IL-6)等。这些细胞因子中，IL-1 是对炎症最有影响的起直接作用的物  
20 质，它能引起严重的发炎。许多由 IL-1 诱发的炎症，可由 IL-1 受体拮抗剂预防  
和消除，IL-1Ra 能抑制 IL-1 的全部作用，用 IL-1Ra(商品名为 Antri)治疗败血性  
休克的 I、II、III 期的临床研究取得较好的疗效。给急性类风湿关节炎病人皮下  
注射可溶性人重组 IL-1RI,每天 125-1000ug/m2,连续 28 天,约有半数病人的症状和  
体征明显改善。促进 IL-1 释放的物质，如脂多糖和内毒素也能间接引起炎症，因  
25 此通过阻断 IL-1 的释放，抑制 IL-1 的生成或抑制 IL-1 重转化酶(ICE)也能防止或  
消除炎症。

对 RA 直接作用的药物包括 IL-1 受体抗体、天然多肽类 IL-1 受体拮抗剂、天  
然有机化合物，及有机合成小分子。IL-1 受体拮抗剂细胞因子是复杂的天然产物，  
包括能产生发炎和抗炎作用的化合物，IL-1 和 IL-1 受体拮抗剂的平衡是一个精确

5 对 RA 的发病机理进行研究发现, TNF 在该疾病的病理进程中也起着十分关键的作用, 患者或动物模型病变关节腔内的 TNF 水平异常升高<sup>[4-7]</sup>。TNF 是机体内的一种多功能免疫调节分子, 它可以和细胞膜上的受体结合发挥作用, 往往引起靶细胞的死亡(它的名称即来源于此)或招引免疫效应细胞在局部的聚集。由于目前尚不清楚的原因, 它在关节腔内的含量大量升高, 一方面和关节滑膜细胞

10 的受体结合造成该细胞直接损伤, 另一方面, 它可以召集免疫效应细胞聚集至此, 分泌更多的细胞因子, 产生更强更持久的自身免疫反应。

国外有人借助基因工程手段构建了人可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体(sTNF-RII, 又称为 p75)与人 Ig 抗体 Fc 片段的融合蛋白, 研究发现该融合蛋白在离体条件下对 TNF $\alpha$  有中和作用, 因此有可能开发成功治疗类风湿关节炎的特效药物。

25 发明内容:

本发的明目在于提供含可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体(p75)和白介素 I 受体拮抗剂 IL-1Ra 的融合蛋白。

30 本发明目的还在于提供制备本发明融合蛋白的方法。

本发明目的还在于提供含有本发明融合蛋白的药物组合物。

## 2. 技术方案

为了实现本发明的目的,本发明实施了以下技术方案。

本发明提供了一种融合蛋白,包含人可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体,人免疫球蛋白 Fc 片段和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra,其氨基酸序列包含 SEQ ID NO:1。

该融合蛋白的成熟活性形式共含 619 个氨基酸,其中第 1-235 位是 p75 的氨基酸序列(GeneBank NM\_001066),第 236-467 位是人 Fc 片段的氨基酸序列,第 468-619 位是 IL-1Ra 的氨基酸序列(GeneBank X50125)。当然,也可以将 p75 连接于 Fc 片段的 C 端而将 IL-1Ra 连接于其 N 端,得到 SEQ ID NO:2 所示的融合蛋白。

本发明还提供了另一种融合蛋白,包含人可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体,连接序列和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra,其氨基酸序列包含 SEQ ID NO:3。

该融合蛋白的成熟活性形式共含 619 个氨基酸,其中第 1-152 位是 IL-1Ra 的氨基酸序列(GeneBank X50125),第 153-167 位是连接序列,第 168-402 位是 p75 的氨基酸序列(GeneBank NM\_001066)。同理,也可以将 IL-1Ra 连接于连接序列的 C 端而将 p75 连接于连接序列的 N 端,得到 SEQ ID NO:4 所示的融合蛋白。

当将两个基因或基因片段重组成一个编码区构成融合蛋白的编码序列时,两个目标片段之间往往需要加入一个连接序列。连接序列的长度对两蛋白的折叠和稳定性非常重要。如果连接序列太短,可能影响两蛋白高级结构的折叠,从而互相干扰,如果连接序列太长,又涉及免疫原性的问题。设计连接序列时应遵循的一般原则包括:1)要使用其编码的多肽不能具有形成二级结构的能力;2)其编码的多肽不能由糖基化信号;3)不能有过多的疏水氨基酸。有鉴于此,本发明设计了具有较好的弹性和疏水性的连接序列(Gly4Ser)<sub>3</sub>(SEQ ID NO:9),将 IL-1Ra 和可溶性肿瘤坏死因子受体 p75 分别连接于其两端。获得的融合基因克隆到真核表达载体,使其在 CHO 细胞中获得高效表达。

根据以上所述的氨基酸序列,本技术领域人员可方便地用各种已知方法制得本发明的融合蛋白。这些方法例如但不限于:重组 DNA 法,人工合成,等[参见 Murray KM, Dahl SL Ann: Pharmacother 1997 Nov;31(11):1335-8]。此外,本发明提供了编码本发明的融合蛋白核酸分子之一,包含 SEQ ID NO:5 或 6 所示的序列。本发明还提供了编码本发明另一融合蛋白的核酸分子,包含 SEQ ID NO:7 或 8 所示的序列。

虽然以上给出了编码本发明融合蛋白的特定的 DNA 分子核苷酸序列,但是,

本文所述的编码核酸包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA),还包括由核苷酸类似物形成的DNA或RNA的等效物、类似物,单链(有义链或反义链)和双链聚核苷酸。还包括以上所述序列的同源序列。

5 本发明还提供了一种表达载体,包含一段选自 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:8 的序列和与之操作性连接的表达调控序列。表达载体可采用市售的例如但不限于: pDR(New England Biolabs 产品), pUC18 等可用于真核细胞系统表达的载体。本领域技术人员不难根据宿主细胞来选择合适的表达载体,例如,当本发明选择 CHO 为宿主细胞时,即可确定 pDR 为其适合的表达载体之一。将本发明的编码核酸序列导入所选的空载体中即可得到本发明的表达载体,本发明实施方式之一  
10 一是含有本发明融合蛋白编码序列 SEQ ID NO:3 的质粒 pDR-(p75Ig-IL1Ra),其酶切特征见图 2。

本发明还提供了表达本发明融合蛋白的宿主细胞,其中含有本发明的编码序列 SEQ ID NO:3 或 4。所述的宿主细胞为常用的真核细胞,例如但不限于 CHO, COS 细胞, 293 细胞, RSF 细胞等。

15 本发明还提供一种用重组 DNA 制备本发明融合蛋白的方法,其步骤包括:

- 1) 提供编码融合蛋白的核酸序列,所述序列选自 SEQ ID NO:5 至 SEQ ID NO:8;
- 2) 构建合适的表达载体;
- 3) 将该表达载体导入合适的宿主细胞;
- 20 4) 在适合表达的条件下培养转化宿主细胞;
- 5) 收集上清液,并纯化融合蛋白产物。

根据本文所述的核苷酸序列,本技术领域人员可方便地用各种已知方法制得本发明的编码核酸。这些方法例如但不限于:制备 PCR, DNA 合成(J. 萨姆布鲁克,《分子克隆实验指南》)。

25 根据已知空载表达载体的酶切图谱,本领域技术人员可按照常规方法通过限制性酶剪切与拼接,将本发明的编码序列插入合适的限制性位点,制得本发明的表达载体,例如图 2 所示的 pDR-(p75Ig-IL1Ra)和图 3 所示的 pDR-(IL1Ra-连接序列-p75)。

实施方式之一中,可通过交叠 PCR 来构建本发明的编码核酸序列,参见图 1  
30 ,其中,基于已知序列的引物设计,制备,以及 PCR 反应参数的设定和控制可参考 US6406863 中所述的 PCR 反应。

将所述编码序列导入宿主细胞可采用本领域的多种已知技术,例如但不限

于：磷酸钙沉淀，原生质体融合，脂质体转染，电穿孔，微注射，反转录法，噬菌体转导法，碱金属离子法。

有关宿主细胞的培养和表达可参见 Olander RM Dev Biol Stand 1996;86:338。

可通过离心去除悬浮液中的细胞和残渣，收集清液。可通过电泳进行鉴定。

- 5 本发明还提供了含有本发明融合蛋白和药学上认可的载体的用于治疗 RA 的药物组合物。除作为有效成分的本发明融合蛋白之外，所述药物组合物中还可含有常规赋形剂，并可制成各种剂型。相关内容可参见《最新药物制剂技术及应用》安书麟、王宪洪等译。

- 10 通过以上所述并结合后文实施方式，本领域技术人员不难看出本发明的上述及其他特征和优点。

#### 附图说明

- 图 1：本发明构建的 pDR-(p75Ig-IL1Ra)的酶切图。其中，HCMV—人细胞巨  
化病毒启动子，是主要瞬时早期启动子；BGH pA—牛生长激素多聚腺嘌呤信号  
；SV40 ori—猿病毒 40 早期启动子和复制起始位点；DHFR—二氢叶酸还原酶基  
15 因；pUC ori—质粒的复制起始位点；AmpR— $\beta$ 内酰胺酶基因。

图 2：本发明构建的 pDR-(IL1Ra-连接序列-p75)的酶切图。

#### 具体实施方式

##### 实施例 1：p75-Ig-IL1Ra 融合蛋白的表达

- 20 1. 构建含编码核酸 SEQ ID NO:1 的质粒 pGEMT-(p75-Ig-IL1Ra)

##### 1. 1: pGEMT-p75Ig 的制备:

根据 p75 序列设计 5'端引物 P1(SEQ ID NO:11):

5'CAGaagcttATGttgccgccaggtggcatttacaccctac

- 25 其中，在 5'端依次引入 3 个保护碱基 CAG，一个 HindIII 酶切位点 aagctt，  
和一个起始密码子 ATG。

根据 p75 序列和 Ig 序列设计跨接 p75 的 3'端和 Ig Fc 的 5'端的引物 P2(SEQ ID NO:12):

5'gtcgcaggacttgggctcgtgccagtgctcccttc

- 30 设计的多核苷酸片段委托上海生工生物工程有限公司代为合成并进行 PAGE  
纯化，参照文献 Chrisostomos Prodromou and Laurence H, Pearl(1992)的方法进行  
片段的合成。

合成好的片段按照 22μg/μl 的浓度溶于灭菌的三蒸水中，以 p75 的序列 (GeneBank NM\_001066)为模板，以 P1 和 P2 作为引物，用市售 PCR 试剂盒按照以下方法进行 PCR：

反应体系的组成：

成分	数量 (μl)
10X PCR 反应缓冲液	10
25 mM Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10
Taq 酶 (5U/μl)	2
引物 (2μg/μl)	各 1μl
模板 (2ug/ml)	
灭菌三蒸水	至 100μl

- 5      反应条件：
- 预变性：94℃，2 分钟；
- 主循环：94℃，1 分钟；55℃，1 分钟；72℃，3 分钟；
- 循环数：20
- 后延伸：72℃，5 分钟。
- 10     PCR 过程在 PROGENE Genium 热循环仪上进行。
- 按照上述条件进行 PCR。完毕后将产物在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳进行鉴定，发现有一条分子量在 720bp 左右的条带，用 Promega 公司的胶回收试剂盒回收该片段，操作按照厂家的说明书进行。
- 15     根据 Ig 片段的序列设计 3'端引物 P3(SEQ ID NO:13)：
- 5'-cttgccgggggacagggac
- 以 Ig Fc 片段的序列(GeneBank X52015)和以上制得的 720bp DNA 片段为模板，以 p75 的 5'端引物 P1 和 Ig Fc 片段的 3'端引物 P3 作为引物，用市售 PCR 试剂盒如前所述进行 PCR。
- 20     完毕后将产物在 0.8%琼脂糖凝胶电泳上进行鉴定，发现有一条分子量在 1400bp 左右的条带，用 Promega 公司的胶回收试剂盒回收该片段，操作按照厂家的说明书进行。
- 获得的 DNA 按照常规方法克隆到 pGEMT 载体上后转化大肠杆菌并进行蓝白斑筛选。通过酶切鉴定和测序确认了一个序列完全正确的克隆，即为 pGEMT-
- 25     (p75-Ig)。



### 1. 2: pGEMT-IL1Ra 的制备:

根据 IL1Ra 的序列设计引物上游引物 (5') P4 (SEQ ID NO:14) 和下游引物 (3' 端) P5 (SEQ ID NO:15):

P4: 5'CAGGgaccctctgggagaaaatccagcaag

5 P5: 5'CAGggaattcctctcgtcctcctggaagtag

其中, cag 为保护碱基, gaattc 为 EcoRI 酶切位点引物委托上海生工生物工程有限公司代为合成并进行 PAGE 纯化。

以 IL1Ra 序列 (GeneBank X50125) 为模板, 以 P4 和 P5 为引物, 按前述方法和条件进行 PCR。在琼脂糖凝胶上电泳, 获得分子量约为 460bp 的条带, 进行凝  
10 胶回收。

获得的 DNA 按照常规方法克隆到 pGEMT 载体上后转化大肠杆菌并进行蓝白斑筛选。通过酶切鉴定和测序确认序列完全正确的克隆, 为 pGEMT-IL1Ra。

### 1. 3: pGEMT-(p75-Ig-IL1Ra) 即 (SEQ ID NO:1) 的获得:

15 根据 IL1Ra 和 Ig 的序列设计跨接 IL1Ra 的 5'端和 Ig 的 3'端的引物 P6 (SEQ ID NO:16):

5'gtccctgtccccggcaagcgaccctctgggagaaaatc

以前面制备的 pGEMT-p75Ig 和 pGEMT-IL1Ra 为模板, 以 IL1Ra 的下游引物 P5 和跨接引物 P6 为引物, 按照前面方法进行 PCR。完毕后将产物在 0.8% 琼脂糖  
20 凝胶电泳上进行鉴定, 回收分子量约在 475bp 的条带, 纯化获得 DNA 片段。以该片段和 pGEMT-p75Ig 为模板, 以 P1 和 P5 为引物进行 PCR, 然后产物进行琼脂糖电泳, 发现有一条分子量在 1857bp 的条带, 用 Promega 公司的胶回收试剂盒回收该片段, 操作按照厂家的说明书进行。

获得的 DNA 按照常规方法克隆到 pGEMT 载体上, 转化大肠杆菌并进行蓝  
25 白斑筛选。通过酶切鉴定和测序确认了一个序列完全正确的克隆, 即为 pGEMT-p75-Ig-IL1Ra (SEQ ID NO:1)。

### 2. 表达载体 pDR-(p75-Ig-IL1Ra) 的构建

用 HindIII 和 EcoRI (Promega) 双酶消化, 将 p75-Ig-IL1Ra 基因片段从  
30 pGEMT-(p75Ig-IL1Ra) 载体上切下, 克隆到经同样双酶消化的 pDR 载体 (New England Biolabs 产品) 中, 得到 pDR-(p75-Ig-IL1Ra)。酶切鉴定构建的表达载体。

### 3. CHO 细胞的转染

用脂质体转染法将表达载体 pDR-(IL1Ra-连接序列-p75)导入 CHO-dhfr<sup>-</sup>细胞 (从 Invitrogen 或 Gibco 公司购买获得)。转染试剂盒购自 Invitrogen 公司, 转染操作程序按照厂家的说明书进行。转染进行 24 小时后换选择培养基进行筛选, 选择培养基为: 15%胎牛血清(Gibco)+RPM1640/DEME。于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待克隆形成后用二氢叶酸还原酶抑制剂氮甲喋呤(MTX)进行加压筛选, 浓度从  $2 \times 10^{-8}$  mol/L 到  $5 \times 10^{-7}$  mol/L 梯度加压, 用有限稀释法进行亚克隆。

### 4. 表达

- 10 将筛选得到的高表达克隆用无血清培养基 CHO-S-SFM II 培养基(Gibco 公司产品)扩大培养: PH 值为 7.0-7.2; 温度  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ; 葡萄糖浓度 1.0-1.5g/L。

产物蛋白为分泌型, 用离心收集的方法去掉细胞和细胞残渣后, 获得含有表达产物的上清。

- 15 rProtein A 亲和层析柱分离纯化表达的融合蛋白。将纯化后融合蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析: 将经离子交换柱层析纯化后的蛋白上样 10 $\mu\text{g}$  进行 SDS-PAGE 后以考马斯亮蓝 G250 染色; 相同纯化样品上样 6 $\mu\text{g}$  行 SDS-PAGE 后以硝酸银染色, 以 BECKMAN DU650 分光光度计分别对两种染色的着色带进行光谱分析, 以确定最佳扫描波长(考马斯亮蓝染色: 600nm; 硝酸银染色: 490nm), 然后进行胶扫描(每毫米读数 2 次), 经仪器对扫描峰进行自动面积积分, 得出目的蛋白峰的含量和纯度。实验结果显示, 我们所得到的蛋白纯度不低于 98%。
- 20

### 实施例 2: IL1Ra-连接序列-p75 融合蛋白的表达

#### 1. pGEM-(IL1Ra-连接序列-p75)即编码核酸 SEQ ID NO:3 的制备

- 参见图 1b, 本发明通过交叠 PCR 构建编码 IL1Ra-连接序列-p75 融合蛋白的 SEQ ID NO:3 序列。其中, 实线表示 IL1Ra 基因, 虚线表示 p75Ig 基因。箭头表示基因从 5'-3'方向复制。PCR1 反应使用引物 a 和 b, 以 pGEMT-IL1Ra 载体为模板生成 ab 产物(IL1Ra), PCR2 反应是另一个 PCR 反应, 使用引物 c 和 d, 以 pGEMT-p75 载体为模板生成 cd 产物(p75)。Oligo-b 的 5'端与 oligo-c 的 5'端互补。交叠 PCR 即在已经获得 ab 和 cd 片段的情况下, 使用引物 a 和 d, Oligo-b 的 5'端与 oligo-c 的 5'端互补所成单链为模板继续 PCR 反应, 得到完整的长链融合基因。
- 25
- 30

根据前面所述的 IL1Ra 和 p75 序列以及连接序列, 设计如下引物:

跨接引物 P7(SEQ ID NO:17):

aatgccacctggcgggcgaGGAGCCGCCGCCGAGCCGCCGCCGCCGAGCCG

CCGCCGCCctcgtcctcctggaagtag

该引物的5'端与p75的5'端重叠，中间大写划线部分为连接序列(45bp)，3'端与IL1Ra的3'端重叠。

IL1Ra的5'端引物P8(SEQ ID NO:18):

5 P8: 5'CAGaagcttATGcgacccctctggagaaaatccagcaag

其中，在5'端依次引入保护碱基CAG，HindIII酶切位点aagctt和一个起始密码子ATG。

p75的3'端引物P9(SEQ ID NO:19):

10 P9: 5'CAGgaattcgtgccagtgctcccttcagc

其中，在5'端依次引入保护碱基CAG和EcoRI酶切位点gaattc。

以实施例1制备的pGEMT-IL1Ra为模板，以P7和P8为引物，按前述方法和条件进行PCR。产物在琼脂糖凝胶上电泳，获得分子量约为500p的条带，进行凝胶回收获得所需的DNA片段。然后以该产物与前述pGEMT-(p75-Ig)为模板以P8和P9为引物，进行PCR，产物在琼脂糖凝胶上电泳，获得分子量约为1200bp  
15 的条带，进行凝胶回收获得所需的DNA片段IL1Ra-连接序列-p75，即SEQ ID NO:3。

获得的DNA按照常规方法克隆到pGEMT载体上后转化大肠杆菌并进行蓝白斑筛选。

通过酶切鉴定和测序确认序列完全正确的克隆pGEM-(IL1Ra-连接序列-p75)。

20

## 2. 表达载体pDR-(IL1Ra-连接序列-p75)的构建

用HindIII和EcoRI(Promega)双酶消化，将IL1Ra-连接序列-p75基因片段从pGEMT-(IL1Ra-连接序列-p75)载体上切下，克隆到经同样双酶消化的pDR载体(New England Biolabs产品)中，得到pDR-(IL1Ra-连接序列-p75)。酶切鉴定构建  
25 的表达载体。

## 3. CHO细胞的转染

用脂质体转染法将表达载体pDR-(IL1Ra-连接序列-p75)导入CHO-dhfr<sup>-</sup>细胞(从Invitrogen或Gibco公司购买获得)。转染试剂盒购自Invitrogene公司，转染操作程序按照厂家的说明书进行。转染进行24小时后换选择培养基进行筛选，  
30 选择培养基为：15%胎牛血清(Gibco)+RPM1640/DEME。于37℃，5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。待克隆形成后用二氢叶酸还原酶抑制剂氨甲喋呤(MTX)进行加压筛选，浓度从2×10<sup>-8</sup>mol/L到5×10<sup>-7</sup>mol/L梯度加压，用有限稀释法进行亚克隆。

## 4. 表达

将筛选得到的高表达克隆用无血清培养基 CHO-S-SFM II 培养基(GiBco 公司产品)扩大培养。PH 值为 7.0-7.2; 温度  $37\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ; 葡萄糖浓度 1.0~1.5g/L。

产物蛋白为分泌型产物, 用离心收集的方法去掉细胞和细胞残渣后, 获得含有表达产物的上清。

- 5        rProtein A 亲和层析柱分离纯化表达的融合蛋白。将纯化后融合蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析: 将经离子交换柱层析纯化后的蛋白上样 10 $\mu\text{g}$  进行 SDS-PAGE 后以考马司亮蓝 G250 染色; 相同纯化样品上样 6 $\mu\text{g}$  行 SDS-PAGE 后以硝酸银染色, 以 BECKMAN DU650 分光光度计分别对两种染色的着色带进行光谱分析, 以确定最佳扫描波长(考马司亮蓝染色: 600nm; 硝酸银染色: 490nm),
- 10        然后进行胶扫描(每毫米读数 2 次), 经仪器对扫描峰进行自动面积积分, 得出目的蛋白峰的含量和纯度。实验结果显示, 我们所得到的蛋白纯度不低于 98%。

## 序列表

<110> 上海兰生上科创业投资有限公司

5 <120> 含可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra 的融合蛋白, 其制备方法, 及其药物组合物

<130> 023430

10 <160> 19

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

15 <211> 619

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

20 <221> misc\_feature

<223> p75-Ig-IL1Ra 融合蛋白

<400> 1

25 Leu Pro Ala Glu Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser  
1 5 10 15  
Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys  
20 25 30  
Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr  
30 35 40 45  
Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu  
50 55 60  
Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser  
65 70 75 80  
35 Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys  
85 90 95  
Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys  
100 105 110  
Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala  
40 115 120 125

	Arg	Pro	Gly	Thr	Glu	Thr	Ser	Asp	Val	Val	Cys	Lys	Pro	Cys	Ala	Pro
	130						135					140				
	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Thr	Ser	Ser	Thr	Asp	Ile	Cys	Arg	Pro	His	
	145				150					155					160	
5	Gln	Ile	Cys	Asn	Val	Val	Ala	Ile	Pro	Gly	Asn	Ala	Ser	Met	Asp	Ala
					165					170					175	
	Val	Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr	Arg	Ser	Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Val
					180				185					190		
	His	Leu	Pro	Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Arg	Ser	Gln	His	Thr	Gln	Pro	Thr
10		195						200					205			
	Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser	Phe	Leu	Leu	Pro	Met	Gly
		210					215					220				
	Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	225				230						235					240
15	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
					245					250					255	
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				260						265				270		
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
20		275						280					285			
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
		290					295					300				
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
	305				310						315					320
25	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
					325					330					335	
	Lys	Asp	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Met
			340						345					350		
	Gln	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
30		355						360					365			
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		370					375						380			
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Arg	His	Ile	Ala	Val	Glu
	385				390						395					400
35	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
					405					410					415	
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			420					425						430		
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
40		435						440					445			

```

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
  450                      455                      460
Pro Gly Lys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe
  465                      470                      475                      480
5  Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln
      485                      490                      495
Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys
      500                      505                      510
Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His
10      515                      520                      525
Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg
  530                      535                      540
Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys
  545                      550                      555                      560
15  Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr
      565                      570                      575
Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met
      580                      585                      590
Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val
20      595                      600                      605
Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu
      610                      615

25  <210> 2
      <211> 619
      <212> PRT
      <213> 人工序列

30  <220>
      <221> misc_feature
      <223> IL1Ra-Ig-p75 融合蛋白

      <400> 2
35
Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp
  1                      5                      10                      15
Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala
      20                      25                      30
40  Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val

```

	35	40	45
	Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys		
	50	55	60
	Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu		
5	65	70	75
	Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys		
	85	90	95
	Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu		
	100	105	110
10	Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp		
	115	120	125
	Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr		
	130	135	140
	Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
15	145	150	155
	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
	165	170	175
	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
	180	185	190
20	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
	195	200	205
	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
	210	215	220
	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
25	225	230	235
	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Asp Tyr		
	245	250	255
	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Met Gln Lys Thr		
	260	265	270
30	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
	275	280	285
	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
	290	295	300
	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Arg His Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
35	305	310	315
	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
	325	330	335
	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
	340	345	350
40	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		



```

          355          360          365
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    370          375          380
Leu Pro Ala Glu Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
5  385          390          395          400
Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
          405          410          415
Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
          420          425          430
10 Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
    435          440          445
Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
    450          455          460
Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
15 465          470          475          480
Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
          485          490          495
Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
          500          505          510
20 Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
    515          520          525
Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
    530          535          540
Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
25 545          550          555          560
Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
          565          570          575
His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
          580          585          590
30 Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
    595          600          605
Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp
    610          615

35
<210> 3
<211> 402
<212> PRT
<213> 人工序列

40

```

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; IL1Ra-连接序列-p75 融合蛋白

5 &lt;400&gt; 3

```

Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp
1           5           10           15
Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala
10          20          25          30
Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val
35          40          45
Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys
50          55          60
15 Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu
65          70          75          80
Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys
85          90          95
Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu
100         105         110
20 Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp
115         120         125
Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr
130         135         140
25 Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
145         150         155         160
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Pro Ala Glu Val Ala Phe Thr Pro
165         170         175
Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp
180         185         190
30 Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala
195         200         205
Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu
210         215         220
35 Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser
225         230         235         240
Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr
245         250         255
Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala
260         265         270
40

```

```

Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys
275                280                285
Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val
290                295                300
5 Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser
305                310                315                320
Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro
325                330                335
Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg
10                340                345                350
Ser Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg
355                360                365
Ser Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr
370                375                380
15 Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr
385                390                395                400
Gly Asp

```

20

```

<210> 4
<211> 402
<212> PRT
<213> 人工序列

```

25

```

<220>
<221> misc_feature
<223> p75-连接序列-ILIRa 融合蛋白

```

30 &lt;400&gt; 4

```

Leu Pro Ala Glu Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1                5                10                15
Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
35                20                25                30
Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
35                40                45
Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50                55                60
40 Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser

```

	65		70		75		80									
	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Cys	Thr	Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys
				85					90					95		
	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys
5			100				105				110					
	Arg	Leu	Cys	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala
			115				120				125					
	Arg	Pro	Gly	Thr	Glu	Thr	Ser	Asp	Val	Val	Cys	Lys	Pro	Cys	Ala	Pro
			130				135				140					
10	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Asp	Ile	Cys	Arg	Pro	His
			145			150				155				160		
	Gln	Ile	Cys	Asn	Val	Val	Ala	Ile	Pro	Gly	Asn	Ala	Ser	Met	Asp	Ala
			165				170				175					
	Val	Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr	Arg	Ser	Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Val
15			180				185				190					
	His	Leu	Pro	Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Arg	Ser	Gln	His	Thr	Gln	Pro	Thr
			195				200				205					
	Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser	Phe	Leu	Leu	Pro	Met	Gly
			210				215				220					
20	Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
			225			230				235				240		
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Pro	Ser	Gly	Arg	Lys
			245				250				255					
	Ser	Ser	Lys	Met	Gln	Ala	Phe	Arg	Ile	Trp	Asp	Val	Asn	Gln	Lys	Thr
25			260				265				270					
	Phe	Tyr	Leu	Arg	Asn	Asn	Gln	Leu	Val	Ala	Gly	Tyr	Leu	Gln	Gly	Pro
			275				280				285					
	Asn	Val	Asn	Leu	Glu	Glu	Lys	Ile	Asp	Val	Val	Pro	Ile	Glu	Pro	His
			290				295				300					
30	Ala	Leu	Phe	Leu	Gly	Ile	His	Gly	Gly	Lys	Met	Cys	Leu	Ser	Cys	Val
			305			310				315				320		
	Lys	Ser	Gly	Asp	Glu	Thr	Arg	Leu	Gln	Leu	Glu	Ala	Val	Asn	Ile	Thr
			325				330				335					
	Asp	Leu	Ser	Glu	Asn	Arg	Lys	Gln	Asp	Lys	Arg	Phe	Ala	Phe	Ile	Arg
35			340				345				350					
	Ser	Asp	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Ser	Phe	Glu	Ser	Ala	Ala	Cys	Pro	Gly
			355				360				365					
	Trp	Phe	Leu	Cys	Thr	Ala	Met	Glu	Ala	Asp	Gln	Pro	Val	Ser	Leu	Thr
			370				375				380					
40	Asn	Met	Pro	Asp	Glu	Gly	Val	Met	Val	Thr	Lys	Phe	Tyr	Phe	Gln	Glu

	385	390	395	400
	Asp Glu			
5	<210> 5 <211> 1857 <212> DNA <213> 人工序列			
10	<220> <221> misc_feature <223> p75-Ig-IL1Ra 融合蛋白的编码序列			
15	<400> 5			
	ttgcccgcgc aggtggcatt tacaccctac gccccggagc cgggagcac atgccggctc 60			
	agagaatact atgaccagac agctcagatg tgcctgcagca aatgctcgcc gggccaacat 120			
	gcanaagctc tctgtaccaa gacctcggac accgtgtgtg actcctgtga ggacagcaca 180			
20	tacaccagc tctggaaactg ggctcccagag tgcctgagct gtggctcccg ctgtagctct 240			
	gaccaggtgg aaactcaagc ctgcactcgg gaacagaacc gcctctgcac ctgcaggccc 300			
	ggctgtgtact gcgcgctgag caagcaggag gggcgccggc tglcgcgccc gctgcgcaag 360			
	tgcgcgccgg gccttcggcgt ggccagacca ggaactgaaa catcagacgt ggtgtgcaag 420			
	ccctgtgccc cggggacgtt ctccaacacg acttcctcca cggatatttg caggcccac 480			
25	cagatctgta acgtgggtggc catccctggg aatgcaagca tggatgcagt ctgcacgtcc 540			
	acgtccccc cccggagtat gggcccaggg gcagtacact taccacagcc agtgtccaca 600			
	cgatcccaac acacgcagcc aacccagaa cccagcactg ctccaagcac ctccctcctg 660			
	ctcccaatgg gcccagccc cccagctgaa gggagcactg gcgacgagcc caagtccctg 720			
	gacaagaccc acacctgccc cccctgcccc gcccccagc tgcctggcgg cccctccgtg 780			
30	ttcctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatct cccgcacccc cgaggtgacc 840			
	tgcgtgtgtg tggacgtgtc ccacgaggac cccgaggatg agttcaactg gtacgtggac 900			
	ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccccgagagg agcagtacaa ctccacctac 960			
	cgcgtgtgtt ccgtgctgac cgtgtgtcac caggactggc tgaacggcaa ggactacaag 1020			
	tgaaggtgt ccaacaaggc cctgcccgcc cccatgcaga agaccatctc caaggccaag 1080			
35	ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacacc ctgccccctt cccgcgacga gctgaccaag 1140			
	aaccaggtgt ccttgacctg cctggtgaag ggcttctacc cccgccacat cgcctgtggag 1200			
	tggaggtcca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccgt gctggactcc 1260			
	gacggctcct tcttctgtga ctccaagctg accgtggaca agtcccgtg gcagcagggc 1320			
	aacgtgttct cctgtctcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1380			
40	ctgtccctgt cccccggcaa gcgacctctt gggagaaaaa ccagcaagat gcaagccttc 1440			

	agaatctggg atgttaacca gaagaccttc tatctgagga acaaccaact agttgctgga	1500
	tacttgcaag gaccaatgt caatttagaa gaaaagatag atgtggtacc cattgagcct	1560
	catgctctgt tcttgggaat ccatggaggg aagatgtgcc tgtcctgtgt caagtctggt	1620
	gatgagacca gactccagct ggaggcagtt aacatcactg acctgagcga gaacagaaag	1680
5	caggacaagc gcttcgcctt caiccgcctca gacagtggcc ccaccaccag ttttagtct	1740
	gccgcctgcc ccggttggtt cctctgcaca gcgatggag ctgaccagcc cgtcagcctc	1800
	accaatatgc ctgacgaagg cgtcatggtc accaaattct acttccagga ggacgag	1857
10	<210> 6	
	<211> 1857	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> IL1Ra-Ig-p75 融合蛋白的编码序列	
	<400> 6	
20	cgaccctctg ggagaaaatc cagcaagaig caagccttca gaatctggga tgttaaccag	60
	aagaccttct atctgaggaa caaccaacta gttgctggat acttgcaagg accaaatgtc	120
	aatttagaag aaaagataga tgttggtacc attgagcctc atgctctgtt cttgggaatc	180
	catggaggga agatgtgcct gtctgtgtgc aagctgtgtg atgagaccag actccagctg	240
25	gaggcagtta acatcactga cctgagcgag aacagaaagc aggacaagcg cttcgccttc	300
	atccgctcag acagtggccc caccaccagt tttgagtctg ccgccigccc cggttggttc	360
	ctctgcacag cgatggaage tgaccagccc gtcagcctca ccaatatgcc tgacgaaggc	420
	gtcatggtca ccaaattcta ctccaggag gacgaggagc ccaagtcctg cgacaagacc	480
	cacacctgcc ccccttgccc cgcctccgag ctgctgggag gcccctccgt gttcctgttc	540
30	cccccaagc ccaaggacac cctgatgac tcccgacccc ccgaggtagc ctgcgtggtg	600
	gtggacgtgt cccacgagga ccccgagggt aagticaact ggtacgtgga cggcgtggag	660
	gtgcacaacg ccaagaccaa gcccccagag gagcagtaca actccaccta ccgcgtggtg	720
	tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aggactacaa gtgcaaggtg	780
	tccaacaagg cctgcccgc ccccatgcag aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc	840
35	cgcgagcccc aggtgtacac cctgcccccc tcccgagacg agctgaccaa gaaccagggtg	900
	tcctgaact gcctgggtgaa gggtttctac ccccgccaca tcgccgtgga gtgggagttc	960
	aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc accccccccg tgcaggactc cgacggctcc	1020
	ttcttctgt actccaagct gaccgtggac aagtcctcgt ggcagcaggc caacgtgttc	1080
	tcctgtctcg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtccctg	1140
40	tccccggca agttgccgc ccaggtagca tttaaccct acgccccgga gcccgggagc	1200

```

    acatgccggc tcagagaata ctatgaccag acagctcaga tglgctgcag caaatgctcg 1260
    ccggggccaac atgcanaagt ctctgtacc aagacctcgg acaccgtgtg tgactcctgt 1320
    gaggacagca catcacccca gctctggaac tgggttccc agtgcttgag ctgtggtcc 1380
    cgctgtagct ctgaccaggt ggaactcaa gctgcactc gggaacagaa ccgcatctgc 1440
5   acctgcaggc ccggttgta ctgcgcgtg agcaagcagg aggggtgccg gctglgcgcg 1500
    ccgctgcga agtgccgcc gggcttcggc gtggccagac caggaactga aacatcagac 1560
    gtggtgtgca agccctgtgc cccggggacg ttctccaaca cgacttcac caccgatatt 1620
    tgaggcccc accagatctg taacgtggtg gccatccctg ggaatgcaag catggatgca 1680
    gtctgcagct ccacgtcccc caccgggagt atggccccag gggcagtaca cttaccccag 1740
10  ccagtgtcca cagatccca acacacgcag ccaactccag aaccacgac tgctccaagc 1800
    acctcttcc tgctccaat gggccccagc ccccagctg aaggagacac tggcgac 1857

```

<210> 7

15 <211> 1206

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

20 <221> misc\_feature

<223> IL1Ra-连接序列-p75 融合蛋白的编码序列

<400> 7

```

25  cgacctctg ggagaaaac cagcaagatg caagcctica gaatctggga tgttaaccag 60
    aagaccttct atctgaggaa caaccaacta gtgtctggat acttgcaagg accaaatgtc 120
    aatttagaag aaaagataga tgtgtaccc atgagcctc atgctctgtt ctgtggaatc 180
    catggaggga agatgtgctt gtcctgtgtc aagtctgtg atgagaccag actccagctg 240
    gaggcagtta acatcactga cctgagcgag aacagaaagc aggacaagcg cttcgccttc 300
30  atccgctcag acagtggccc caccaccagt tttagtctg ccgctgccc cggttgttcc 360
    ctctgcacag cgatggaagc tgaccagccc gtcagcctca ccaatatgcc tgacgaagge 420
    gtcatggta ccaatttcta ctccaggag gacgaggcgc gcggcgctc cggcggcggc 480
    ggctccggcg gcggcgctc ctgcccgc caggtagcat ttacacctta cggcccggag 540
    cccgggagca catgccgct cagagaatac tatgaccaga cagctcagat gtgtgcagc 600
35  aaatgctcgc cgggccaaca tgcaaaagtc ttctgtacca agacctcgga caccgtgtgt 660
    gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact gggltccga glgcttgagc 720
    tgtggctccc gctgtagctc tgaccaggtg gaaactcaag cctgcactcg ggaacagaac 780
    cgcatctgca cctgcaggcc cggctggtac tgcgcgtga gcaagcagga ggggtgccg 840
    ctgtgcgcgc cgctgcgcaa gtccgcccg ggcttcggcg tggccagacc aggaactgaa 900
40  acatcagacg tgggtgtcaa gccctgtgcc ccggggagct tctccaacac gacttcaccc 960

```

	acggatattt gcaggcccca ccagatctgt aacgtggtgg ccatccctgg gaatgcaagc	1020
	atggatgcag tctgcaagtc cacgtccccc acccggagta tggccccagg ggcagtacac	1080
	ttaceccagc cagigtccac acgatcccaa caccgcagc caactccaga acccagcaet	1140
	gtccaagca cctccttctt gctcccaatg ggccccagcc cccagctga agggagcaet	1200
5	ggcgac	1206
	<210> 8	
	<211> 1206	
10	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
15	<223> p75-连接序列-IL1Ra 融合蛋白的编码序列	
	<400> 8	
	ttgcccgccc aggtggcatt tacacctac gccccggagc ccgggagcac atgccggctc	60
20	agagaatact atgaccagac agctcagatg tgcctgagca aatgctcgcc gggccaacat	120
	gcaaaagict tctgtaccaa gacctcggac accgtgtgtg actcctgtga ggacagcaca	180
	tacaccagc tctggaactg ggttcccag tgcctgagct gtggctcccg ctgtagctct	240
	gaccaggttg aaactcaagc ctgcactcgg gaacagaaac gcactctgac ctgcaggccc	300
	ggctggtaet gcgcgctgag caagcaggag gggcgccggc tgtgcgcgcc gctgcgcaag	360
25	tgccgcccgg gcttcggcgt ggcagacca ggaactgaaa catcagacgt ggtgtgcaag	420
	ccctgtgccc cggggacgtt ctccaacacg acttcaccca cggatatttg caggccccac	480
	cagatctgta acgtgggtgg catccctggg aatgcaagca tggatgcagt ctgcacgtcc	540
	acgtcccca cccggagtai ggccccaggg gcagtacact taccagccc agtgtccaca	600
	cgtcccaac acacgcagcc aactccagaa cccagcactg ctccaagcac ctccctctg	660
30	ctcccaatgg gccccagccc cccagctgaa gggagcactg gcgacggcgg cggcggtcc	720
	ggcggcggcg gctccggcgg cggcggtccc cgacctctg ggagaaaatc cagcaagatg	780
	caagccttca gaatctggga tgttaaccag aagaccttct atctgaggaa caaccaacta	840
	gttgcctgat acttgcaagg accaaatgtc aatttagaag aaaagataga tgggtaccc	900
	attgagctc atgctctgtt ctgggaate catggaggga agatgtgctt gtctgtgtc	960
35	aagctctgtg atgagaccag actccagctg gaggcagtta acatcactga cctgagcgag	1020
	aacagaaaagc aggacaagcg ctccgccttc atccgctcag acagtggccc caccaccagt	1080
	tttgagtctg ccgcttgcgc cgttggttc ctctgcacag cgaiggaagc tgaccagccc	1140
	gtcagcctca ccaatatgcc tgacgaaggc gtcattgtca ccaattcta ctccaggag	1200
40	gacgag	1206



---

<210> 9  
<211> 15  
<212> PRT  
5 <213> 人工序列

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> 连接序列  
10

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

15

<210> 10  
<211> 45  
<212> DNA  
20 <213> 人工序列

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> 连接序列的编码序列  
25

<400> 10

GGCGGCGGCG gctccggcgcg cgggcgctcc ggcgggcgcg gctcc  
45

30

<210> 11  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> 人工序列

35

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> 引物

40 <400> 11

---

	cagaagctta tgttgcccgccaggtggca ttacaccct ac	42
5	<210> 12 <211> 36 <212> DNA <213> 人工序列	
10	<220> <221> misc_feature <223> 引物	
	<400> 12	
15	gtgcaggac ttgggtcgt cgccagtgt cccttc	36
	<210> 13 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
20	<220> <221> misc_feature <223> 引物	
	<400> 13	
25	<221> misc_feature <223> 引物	
	<400> 13	
30	cttgccgggg gacagggac	19
	<210> 14 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
35	<220> <221> misc_feature <223> 引物	
	<400> 14	
40	<221> misc_feature <223> 引物	

---

	<400> 14	
	cagcgaccct ctgggagaaa atccagcaag	30
5		
	<210> 15	
	<211> 28	
	<212> DNA	
10	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 引物	
15		
	<400> 15	
	caggaattcc tcgtcctcct ggaagtag	28
20		
	<210> 16	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
25		
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 引物	
30	<400> 16	
	gtccctgtcc cccggcaagc gaccctctgg gagaaaatc	39
35	<210> 17	
	<211> 84	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
40	<220>	

---

<221> misc\_feature  
<223> 引物

<400> 17

5  
aatgccacct ggagcgggcaa ggagccgccg ccgcccggagc cgcgccgcc ggagccgccc 60  
ccgccctcgt cctcctggaa gtag 84

10 <210> 18  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> 人工序列

15 <220>  
<221> misc\_feature  
<223> 引物

<400> 18

20  
cagaagctta tgcgacctc tgggagaaaa tccagcaag 39

<210> 19

25 <211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>

30 <221> misc\_feature  
<223> 引物

<400> 19

35 caggaattcg tcgccagtc tcccttcagc 30

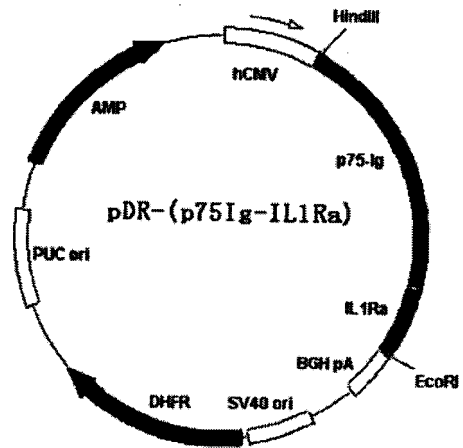


图 1

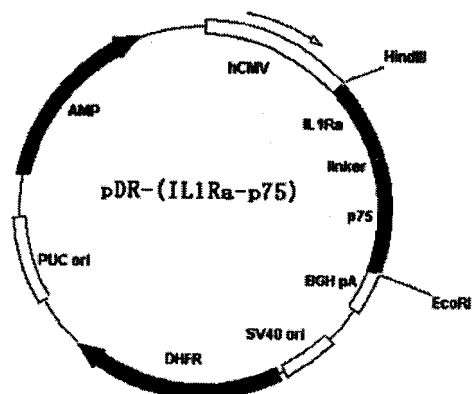


图 2